Aus dem Serologischen Laboratorium (Prof. Dr. F. Georgi)
der Psychiatrischen und Nervenklinik (Direktor: Prof. Dr. J. Lange)
der Universität Breslau

Untersuchungen über die chemische Natur der sogenannten Syphilisantigene. Tierimmunisierungsversuche

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Schlesischen Friedrich Wilhelms-Universität
zu Breslau

vorgelegt von

Tibor Rónai
aus Breslau

Jena
Gustav Fischer
1932

Aus dem Serologischen Laboratorium (Prof. Dr. F. Georgi)
der Psychiatrischen und Nervenklinik (Direktor: Prof. Dr. J. Lange)
der Universität Breslau

Untersuchungen über die chemische Natur der sogenannten Syphilisantigene. Tierimmunisierungsversuche

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Schlesischen Friedrich Wilhelms-Universität
zu Breslau

vorgelegt von

Tibor Rónai
aus Breslau

Jena
Gustav Fischer
1932

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Breslau.

1. Referent: Prof. Dr. Georgi.
2. Referent: Prof. Dr. Lange.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Abdruck aus der
Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie.
Bd. 75. 1932.
Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

Die ursprüngliche Auffassung von Wassermann, Neisser und Bruck (1) über das Wesen der Wassermannschen Reaktion, wonach diese eine Reaktion zwischen Spirochätenbestandteilen und ihren Antikörpern darstellen sollte, konnte nicht mehr aufrecht erhalten werden, nachdem von Landsteiner, Müller und Pötzl (2), Levaditi und Yamanouchi (3), Porges und Meier (4) gezeigt worden ist, daß auch alkoholische Extrakte aus normalen Organen zum Zwecke des serologischen Syphilisnachweises geeignet sind.

Aber auch die Erklärung von Weil und Braun (5), daß es sich bei dieser Reaktion um den Nachweis von Autoantikörpern handle, die durch eine Immunisierung mit den beim syphilitischen Gewebszerfall freigewordenen Lipoiden entstanden sind, konnte keine allgemeine Anerkennung erlangen. War doch die Möglichkeit einer solchen Autoimmunisierung keineswegs experimentell bewiesen, und darüber hinaus war es sehr fraglich, ob die Lipoide Antikörper erzeugen können.

Man nahm daher an, daß die Wassermannsche Reaktion wie auch die inzwischen entdeckten Flockungsreaktionen überhaupt keine echte Antigen-Antikörperreaktion darstellen, sondern daß hier zwar für die Syphilis charakteristische, aber im immunbiologischen Sinne unspezifische, kolloidale Reaktionen vorliegen. Diese Auffassung wurde noch bekräftigt durch die Untersuchungen von Sachs (6), Sachs und Altmann (7), Sachs und Rondoni (8) sowie Sachs und W. Georgi. Diese Autoren konnten nämlich nachweisen, daß der kolloidale Zustand der Extrakte für den Ausfall der Reaktion von außerordentlicher Wichtigkeit ist (optimal ist eine durch fraktionierte Verdünnung erreichte grob disperse Beschaffenheit der Extrakte) und weiterhin, daß ein Cholesterinzusatz ebenfalls imstande ist, die Empfindlichkeit der Extrakte bei der Komplementablenkungsreaktion zu steigern und die Flockungsreaktion nach Sachs und Georgi überhaupt erst zu ermöglichen.

Allerdings sind gegen eine solche rein kolloidchemische Auffassung der serologischen Syphilisreaktionen schon seinerzeit wichtige Einwände erhoben worden. So konnten die Organextrakte durch keinerlei anderes künstliches kolloidales System vollwertig ersetzt werden. Auch war eine sich auf die Syphilis beschränkende kolloidale Veränderung der verschiedenen Körperflüssigkeiten (Serum-, Liquor-, Aszitesflüssigkeit), die ja von vornherein eine voneinander sehr abweichende kolloidale Struktur besitzen, kaum denkbar. Die immunbiologische Auffassung der serologischen Syphilisreaktionen wurde daher von einer Reihe von Autoren weiter verfochten [Toyosumi, Breinl, Mundt, Nakano (9)].

Eine gewisse Klärung der Fragestellung ist durch die Untersuchungen von Landsteiner und Simms (10), sowie Sachs, Klopstock und Weil (11) eingetreten. Landsteiner konnte nämlich zeigen, daß die Lipoide, wenn auch nicht allein, so doch gekoppelt an artfremdes Eiweiß, imstande sind, Antikörper zu erzeugen, die mit den zur Immunisierung benutzten Lipoiden in vitro auch ohne Eiweiß reagieren können. Damit war der eine Einwand gegen die immunbiologische Auffassung der Wassermannschen Reaktion, der sich auf das fehlende Immunisierungsvermögen der Lipoide gestützt hatte, hinfällig geworden. Doerr und Hallauer (12) sowie Heinsheimer (13) gelang es sogar, nachzuweisen, daß die Eiweiß- und Lipoidkomponenten des zur Immunisierung verwandten Komplexes voneinander unabhängige Eiweiß- bzw. Lipoidantikörper erzeugen, und somit die Anwesenheit von artfremdem Eiweiß zwar die Lipoidantikörperbildung erst ermöglicht, diese jedoch durch die Lipoide selbst bewirkt wird.

Der zweite Einwand, der sich, wie oben erwähnt, gegen die Annahme richtete, daß körpereigene Substanzen zur Antikörpererzeugung fähig sind, wurde durch die Versuche von Sachs, Klopstock und Weil (11) entkräftigt. Diese Autoren haben den Nachweis erbracht, daß auch mit arteigenen Lipoiden (gekoppelt an artfremdes Eiweiß) beim Kaninchen Lipoidantikörper erzielt werden können. Auf Grund ihrer Versuche modifizierten sie die ursprüngliche Theorie von Weil und Braun insofern, als sie annahmen, daß die bei der syphilitischen Erkrankung freigewordenen Lipoide sich an Spirochätenbestandteile koppeln und somit auch in vivo antigene Funktion erlangen. Auf die weiteren Arbeiten von Brandt, Guth und Müller (14), Heimann und Steinfeld (15), F. Georgi und Ö. Fischer (16) u. a., welche die Organspezifität gewisser Lipoide bewiesen haben, sowie auf die Arbeiten

von Klopstock (17), Kroó und Schulze (18) usw., die sich mit der Frage beschäftigt haben, inwieweit die Spirochäten allein für die Entstehung der syphilitischen Blutveränderung verantwortlich gemacht werden könnten, soll hier nicht näher eingegangen werden.

Ein weiterer Einwand wurde, wie erwähnt, auf Grund der Wichtigkeit der optimalen Struktur der Extrakte für ihre Antigenfunktion in vitro gegen die immunbiologische Auffassung der syphilitischen Blutveränderung erhoben. Dieser Einwand konnte ebenfalls widerlegt werden durch die Arbeiten von Sachs (19), Freiwirth (20), Gaetani (21). Genannten Autoren gelang es zu zeigen, daß die Bedeutung eines optimalen Extraktzustandes sowie der Cholesterinisierung nicht nur für die serologischen Syphilisreaktionen sondern auch für den Nachweis der im Tierexperiment künstlich erzeugten Lipoidantikörper Geltung hat. Es wurde nämlich festgestellt, daß die Lipoide nur bei einem bestimmten Dispersitätsgrad mit ihren Antikörpern sinnfällig zu reagieren in der Lage sind, und daß bei einem ungünstigen kolloidalen Zustand der Lipoide zwar auch eine Bindung zwischen Lipoiden und Antikörpern, jedoch ohne sinnfällige Manifestation, eintritt. Letzterer Befund wurde sowohl bei den künstlich erzeugten Lipoidantikörpern als auch bei dem serologischen Syphilisnachweis erhoben [Sachs und Bock (22)].

Zusammenfassend kann gesagt werden:

1) Die Lipoidantigene sind — nach Landsteiners Terminologie — Haptene, d. h. Stoffe, die in vitro mit ihren Antikörpern in sinnfälliger Weise reagieren können; ihr Immunisierungsvermögen gewinnen sie jedoch erst durch Bindung an artfremdes Eiweiß. [Siehe Schleppertheorie von Sachs (23).]

2) Die sinnfällige Manifestation der Lipoidantigenfunktion in vitro ist weitgehend von dem Dispersitätsgrad der Lipoidlösung abhängig. Die mit ihren Antikörpern nicht mehr sinnfällig reagierenden, diese aber noch bindenden fein dispersen Lipoide werden von Sachs als Halbhaptene bezeichnet.

Mit der rein immunbiologischen Betrachtungsweise der syphilitischen Blutveränderung ist die Frage nach der chemischen Natur der die Antigenfunktion tragenden Substanzen in den Vordergrund des Interesses gerückt. Schon ältere Untersuchungen

haben gezeigt, daß die für den serologischen Syphilisnachweis notwendigen Extraktbestandteile sich in überwiegender Menge in der azetonunlöslichen Fraktion befinden. So konnten Noguchi und Bronfenbrenner (24), sowie Bordet und Ruelens (25) nachweisen, daß die alkoholischen Organextrakte, die nach einer vorangegangenen Azetonextraktion gewonnen wurden, auch in uncholesteriniertem Zustande für den serologischen Syphilisnachweis geeignet sind. Neuerdings haben J. Kiss (26) und A. Scaltritti (27) Phosphatidfraktionen aus Rinderherz isoliert, die ein gutes Antigen darstellen. Die Untersuchungen von J. Kiss wurden von Ö. Fischer (28, 29) weitgehend bestätigt.

Die Auffassung, wonach das Syphilisantigen mit den Phosphatiden identisch ist, wurde um so mehr plausibel, als es Sachs und Klopstock (30) gelungen war, im Tierversuch mittels der Kombinationsmethode Antikörper gegenüber Eierlezithin (Merck) zu erzielen.

Immerhin erhoben sich wichtige Einwände gegen eine solche Betrachtungsweise. Im Tierversuch konnten nämlich Landsteiner, Levene und van der Scheer (31) gegen gereinigtes Lezithin keine Antikörper erzeugen, sondern nur gegen das käufliche, nicht chemisch reine Präparat. Die mittels Injektion von letzterem hergestellten Antisera reagierten auch nicht mit dem gereinigten sondern nur mit dem käuflichen Präparat.

Die von Kiss und Scaltritti angewandten Phosphatidpräparate kann man auch nicht als chemisch rein betrachten, und es wurde deshalb von Sachs, J. Kiss und Ö. Fischer auf die Möglichkeit hingewiesen, daß die Antigenfunktion vielleicht auch hier nicht den Phosphatiden, sondern diesen anhaftenden Begleitstoffen zukommt.

Diese Auffassung wurde durch die Untersuchungen von Ö. Fischer (32) weitgehend gestützt. Er konnte nämlich zeigen, daß

1. cholesterinfreie Phosphatidpräparate aus Rinderherz, die sich beim serologischen Syphilisnachweis als wirksames Antigen erwiesen haben, dieses Vermögen nach Vorbehandlung mit Aluminiumhydroxyd oder Kalziumphosphat verlieren;

2. daß der Verlust der Extraktfunktion nicht auf gleichzeitige Verminderung der Phosphatide zurückzuführen ist, da

a) die Adsorption mit Kaolin bzw. Bariumsulfat, selbst wenn sie mit Dosen ausgeführt wird, welche die Phosphatide in gleicher Weise vermindern, wie dies durch Aluminiumhydroxyd und Kalziumphosphat geschieht, im besten Falle eine Abschwächung der Extraktfunktion bewirkt,

b) die mit Aluminiumhydroxyd- und Kalziumphosphatadsorption inaktivierten Extrakte durch Einengung nicht reaktiviert werden können.

Nach diesen Resultaten war es von Interesse, zu prüfen, ob die so vorbehandelten Phosphatidpräparate auch in vivo ihre Antigenfunktion eingebüßt haben.

Solche Untersuchungen könnten nämlich Aufschluß darüber geben, ob die bei dem serologischen Syphilisnachweis als eigentliches Antigen fungierende noch unbekannte Extraktfraktion mit der bei den Tierimmunisierungsversuchen die Antikörperbildung bedingenden Extraktfraktion identisch ist. Weiterhin würden diese Versuche eine Erweiterung der Befunde von Sachs und Klopstock, Landsteiner, Levene und van der Scheer bedeuten, da diese Autoren mit Eierlezithin und nicht mit aus Herzmuskel stammenden Phosphatidpräparaten gearbeitet haben.

Allerdings muß man sich bewußt bleiben, daß bei den hier zu beschreibenden Versuchen es sich nicht um chemisch gereinigte Phosphatide handelt, sondern daß durch die Adsorption nur gewisse Fraktionen entfernt worden sind, die zwar anscheinend für die Extraktantigenfunktion verantwortlich zu machen sind, jedoch nicht die Gesamtheit der das Phosphatidpräparat verunreinigenden Begleitstoffe darstellen.

Ö. Fischer diskutiert in seiner Arbeit auch die Möglichkeit, daß nicht die für die Extraktantigenfunktion verantwortlichen Bestandteile durch die Adsorption mit Kalziumphosphat und Aluminiumhydroxyd entfernt worden sind, sondern daß nur der kolloidale Zustand der Extrakte in der Richtung des Halbhaptenzustandes eine Aenderung erfahren hat.

Ö. Fischer lehnt jedoch auf Grund seiner Beobachtungen diese Möglichkeit als unwahrscheinlich ab. Die kolloidale Struktur der Extrakte hatte nämlich durch die Adsorption keine sichtbare Aenderung erfahren und die komplementbindende Kraft der überdosierten Extrakte beim Vorversuch ohne Serum war nicht vermindert. Tierimmunisierungsversuche könnten auch in dieser

Richtung insofern Aufschluß bringen, als bei der Immunisierung bei Anwendung der Kombinationsmethode (also bei Anwesenheit von Eiweißantigen), wenigstens nach den bisherigen Erfahrungen, der kolloidale Zustand des Antigens an sich von keiner Bedeutung ist. [Siehe auch chemospezifische Antigene: Landsteiner (33), Klopstock und Selter (34).]

Eine Komplikation bei Kaninchenimmunisierungsversuchen bedeutet die spontane Wassermannsche Reaktion, die bei dieser Tierart öfters zu beobachten ist. Diese Reaktionsfähigkeit der Kaninchensera wird heute im allgemeinen auf das Interferieren von labilen Globulinen im Sinne von Sachs zurückgeführt. Diese Labilität kann eine unspezifische Flockungs- und Komplementbindungsreaktion bedingen, die prinzipiell von den echten Antigen-Antikörperreaktionen zu unterscheiden ist. Für eine solche Auffassung sprechen u. a. die Versuche von Sachs und F. Georgi (35), die zeigen, daß die Entfernung der labilen Globuline mit HCl-Fällung diese unspezifische Reaktionsweise aufhebt, die spezifische Reaktionsfähigkeit der syphilitischen Kaninchensera dagegen, wenn auch mitunter abgeschwächt, erhalten bleibt. Da nach den Versuchen von Ö. Fischer die mit Adsorbentien vorbehandelten, mit Syphilisseris nicht mehr reagierenden Extrakte, ihre antikomplementäre Wirkung (Vorversuch bei der Wassermannschen Reaktion) quantitativ unverändert besitzen, wäre es denkbar, daß die unspezifische Reaktionsfähigkeit der Kaninchensera sich auch auf diese so vorbehandelten Extrakte erstreckt. Aus diesen Gründen wurden die Sera einer Reihe von Kaninchen, die in keiner Weise vorbehandelt worden waren, gegenüber nativen und absorbierten Extrakten im Komplementablenkungsversuch geprüft.

Methodik: Bei den Komplementbindungsversuchen mit inaktivierten zehnfach verdünnten Kaninchenseris wurden sämtliche Agentien in einem Volumen von je 0,25 ccm benützt. (Gesamtvolumen 1,25 ccm). Die angewandten Extrakte waren:

a) Cholesterinfreies Phosphatidpräparat nach Kiss. Dieses wurde aus mit Azeton getrocknetem Herzpulver mittels Alkoholextraktion, Eindampfen des alkoholischen Extraktes und zweimaliger Fällung des in Aether aufgenommenen Restes mit Azeton hergestellt (genauere Angaben siehe bei Ö. Fischer).

b) Das gleiche Präparat nach Vorbehandlung mit Aluminiumhydroxyd. (10 ccm Extrakt — Trockensubstanzgehalt 2,75 Proz. — wurden mit 1 g Aluminiumhydroxyd versetzt und nach 10 Minuten Schütteln und 24stündigem Stehen abzentrifugiert).

c) Vorbehandlung des Extraktes erfolgte in gleicher Weise wie bei b, jedoch mit 2 g Aluminiumhydroxyd auf 10 ccm Extrakt.

Die Verdünnung der Extrakte geschah im Gegensatz zu der von Ö. Fischer bei den Untersuchungen von menschlichen Syphilisseris angewandten Methode einfach durch fraktioniertes Hinzufügen der 5fachen Menge physiologischer Kochsalzlösung. Orientierende Vorversuche haben nämlich gezeigt, daß die von Ö. Fischer benutzte Methode bei Verwendung von Kaninchenseris im Gegensatz zu den Verhältnissen bei Benutzung von Menschenseris keinerlei wesentliche Vorteile gegenüber der einfachen fraktionierten Verdünnung hat. Die alkoholischen Rohextrakte hatten der geringeren nachträglichen Verdünnung mit physiol. NaCl-Lösung (1/6 statt 1/40 bei Ö. Fischer) entsprechend weniger starke Konzentration und enthielten nur ½ Proz. Trockensubstanz. Die adsorbierten und nativen Extrakte wurden durch nachträgliche Einengung bzw. Verdünnung auf diesen Trockensubstanzgehalt gebracht. Die Ergebnisse zeigt Tabelle I.

Tabelle I.

Hemmung der Hämolyse durch Ambozeptor und Komplement nach Vorbehandlung des letzteren mit Extrakten und Kaninchenseris.

	Nativ. Kiss-Extrakt	Ads. Kiss-Extrakt mit 1 g $Al(OH)_3$ (b)	Ads. Kiss-Extrakt mit 2 g $Al(OH)_3$ (c)
Kaninchenserum No. 1	+	++++	++++
„ „ 2	—	—	—
„ „ 3	—	++++	++++
„ „ 4	++++	++++	++++
„ „ 5	+	++++	++++
„ „ 6	—	—	—
„ „ 7	—	—	—
„ „ 8	—	—	—
„ „ 9	++	++++	++++

Aus der Tabelle ergibt sich die bemerkenswerte Tatsache, daß die vorbehandelten Extrakte in noch höherem Maße als die unvorbehandelten mit einem Teil der Kaninchenseris reagieren.

Dieser Umstand weist darauf hin, daß nach Vorbehandlung mit Adsorbentien und folgender Einengung die Extraktbestandteile, welche die unspezifische Reaktion bedingen, in stärkerem Maße interferieren als vor der Adsorption, was durch die Einengung der Extrakte nach der Adsorption bis zu einem Trockensubstanzgehalt, welcher dem des nativen Extraktes entspricht, zu erklären ist. Es wäre daher von Interesse, zu untersuchen, wie

menschliche Sera, die durch krankhafte Prozesse (Gewebszerfall) eine gesteigerte Labilität der Globuline aufweisen, sich gegenüber adsorbierten Extrakten verhalten. Wichtig ist auch noch die Feststellung, daß für die unspezifische Extraktfunktion anscheinend nicht das Antigen selbst, sondern die Begleitstoffe nicht antigener Natur, wenigstens zum größten Teile, verantwortlich zu machen sind.

Nach diesen orientierenden Vorversuchen wurden Kaninchen, deren Sera sowohl mit vorbehandelten als auch unvorbehandelten Extrakten im Komplementbindungsversuch negativ reagiert und auch bei den Flockungsreaktionen nach Kiss, Sachs-Georgi und Kahn ein negatives Verhalten gezeigt haben, mit nativen und mit adsorbierten Extrakten immunisiert.

Die Herstellung der Gemische zur Immunisierung erfolgte in üblicher Weise [siehe zuletzt bei F. Heimann und E. Weil (36)]. Je 4 ccm der auf 1 Proz. Trockensubstanzgehalt gebrachten Extrakte wurden auf dem Wasserbade verdampft und die Rückstände in 5 ccm zehnfach verdünntem Schweineserum aufgenommen. In zweitägigen Intervallen wurden diese Lösungen, nachdem sie eine Stunde bei Zimmertemperatur gestanden hatten, den Kaninchen intravenös injiziert. Jedes Tier erhielt 8 derartige Injektionen. Das Blut wurde 5 Tage nach der letzten Spritze im Komplementablenkungsversuch und in den Flockungsreaktionen nach Kiss, Sachs-Georgi und Kahn untersucht. Zur quantitativen Auswertung der Komplementablenkungsreaktion wurden absteigende Serummengen genommen. Die Verdünnung der Extrakte erfolgte wie oben beschrieben. Verwandt wurden die Extrakte a bis c und cholesterinierter Rinderherzextrakt Frankfurt (d). Die Flockungsreaktionen wurden in der üblichen Weise ausgeführt. Die Ergebnisse zeigen Tabellen II und III.

Aus den Tabellen II und III ergibt sich, daß die Sera der mit nativem Kiss-Extrakt vorbehandelten Kaninchen sowohl gegen dieses Präparat als auch gegen cholesterinierten Rinderherzextrakt positiv reagieren und auch bei den Flockungsreaktionen ein entsprechendes positives Verhalten zeigen. Die Sera der mit adsorbierten Extrakten behandelten Tiere weisen dagegen ein vollständig negatives Verhalten bei allen hier ausgeführten Reaktionen auf.

Diese Befunde lassen also die interessante Tatsache feststellen, daß die mit Adsorbentien vorbehandelten, mit syphilitischen Seris nicht mehr reagierenden Extrakte auch nicht mehr imstande sind, beim Kaninchen Blutveränderungen hervorzurufen, die den syphilitischen entsprechen.

Tabelle II.

Hemmung der Hämolyse durch Ambozeptor und Komplement nach Vorbehandlung des letzteren mit Extrakten und Kaninchenimmunseris.

Mengen des Serums in ccm	Rinderherzextrakt cholester. (d)	Kissextrakt nativ. (a)	Rinderherzextrakt cholester. (d)	Kissextrakt nativ. (a)
	Sera von Kaninchen, immunisiert mit nativem Extrakt (a)			
	391		398	
0,25	++++	++++	++++	++++
0,15	++++	++++	++++	++++
0,05	++++	++++	++++	++++
0,03	++++	++++	++	++
0,01	—	—	—	—

Tabelle II (Fortsetzung).

Mengen des Serums in ccm	Rinderherzextrakt cholester. (d)	Kissextrakt nativ. (a)	Rinderherzextrakt cholester. (d)	Kissextrakt nativ. (a)	Rinderherzextrakt cholester. (d)	Kissextrakt nativ. (a)
	Sera von Kaninchen, immunisiert mit ads. Extr. (c)				Serum v. Kaninchen, immunisiert mit ads. Extr. (b)	
	399		400		407	
0,25	—	—	—	—	—	—
0,15	—	—	—	—	—	—
0,05	—	—	—	—	—	—
0,03	—	—	—	—	—	—
0,01	—	—	—	—	—	—

Tabelle III.

Flockungsreaktionen nach	Sera von Kaninchen, immunisiert mit				
	nativem Extrakt (a)		ads. Extrakt (b) [1 g $Al(OH)_3$]	ads. Extrakt (c) [2 g $Al(OH)_3$]	
	391	398	407	399	400
Kiss	++++	++	—	—	—
Sachs-Georgi	++++	++	—	—	—
Kahn Extraktmengen in ccm					
0,05	++++	++++	—	—	—
0,025	++++	++++	—	—	—
0,0125	++++	++++	—	—	—

Es hat sich also wieder eine weitgehende Parallelität zwischen der künstlich bei Kaninchen erzeugten Wassermannschen Reaktion und der syphilitischen Serumveränderung gezeigt, ein Umstand, der für die immunbiologische Auffassung der Wassermannschen Reaktion eine weitere Stütze bildet. Weiterhin spricht der Ausfall dieser Tierimmunisierungsversuche aus schon erwähnten Gründen dafür, daß bei der adsorptiven Behandlung der Extrakte in der Tat das Antigen entfernt worden ist.

Wünschenswert war noch festzustellen, wie die Kaninchensera nach der Immunisierung sich gegen mit Adsorbentien vorbehandelte Extrakte verhalten. Es war nämlich denkbar, daß in den mit Adsorbentien vorbehandelten — das Syphilisantigen nicht mehr enthaltenden — Extrakten doch noch andere (vom Syphilisantigen prinzipiell zu unterscheidende) Substanzen antigener Natur interferieren; letztere könnten unter Umständen Antikörper bilden, die aber den beim syphilitischen Krankheitsprozeß entstandenen nicht entsprechen würden. Auf der anderen Seite war an die Möglichkeit zu denken, daß die mit Adsorbentien vorbehandelten Extrakte zwar keinerlei Substanzen antigener Natur enthalten, jedoch noch eine unspezifische Reaktionsfahigkeit mit den Immunseris infolge der durch die Immunisierungsprozesse bedingten Serumlabilität aufweisen. Letztere Erwägung hatte, im Hinblick auf die besondere Eignung der adsorbierten Extrakte — wenigstens nach der von uns vorgenommenen Einengung — mit labilen Seris zu reagieren, einen großen Grad von Wahrscheinlichkeit für sich.

Es wurden also die Kaninchenimmunsera gegenüber den adsorbierten Extrakten im Komplementablenkungsversuch geprüft. Methodisch wurde in der gleichen Weise wie bei den in Tabelle II angegebenen Versuchen vorgegangen. Die Ergebnisse zeigt Tabelle IV.

Aus der Tabelle IV ist zu ersehen, daß die Sera der mit adsorbierten Extrakten vorbehandelten Kaninchen auch gegen adsorbierte Extrakte ein völlig negatives Verhalten zeigen, während die Sera der mit nativem Extrakt vorbehandelten Kaninchen in mehr oder weniger ausgeprägtem Maße auch mit adsorbierten Extrakten reagieren.

Gegen die Annahme, daß die mit Adsorbentien vorbehandelten Extrakte noch — wenn auch vom Wassermanantigen differente —

Tabelle IV.

Hemmung der Hämolyse durch Ambozeptor und Komplement nach Vorbehandlung des letzteren mit Extrakten und Kaninchenimmunseris.

Mengen des Serums in ccm	Kissextrakt ads. mit 1 g $Al(OH)_3$ (b)	Kissextrakt ads. mit 2 g $Al(OH)_3$ (c)	Kissextrakt ads. mit 1 g $Al(OH)_3$ (b)	Kissextrakt ads. mit 2 g $Al(OH)_3$ (c)	Kissextrakt ads. mit 1 g $Al(OH)_3$ (b)	Kissextrakt ads. mit 2 g $Al(OH)_3$ (c)	Kissextrakt ads. mit 1 g $Al(OH)_3$ (b)	Kissextrakt ads. mit 2 g $Al(OH)_3$ (c)	Kissextrakt ads. mit 1 g $Al(OH)_3$ (b)	Kissextrakt ads. mit 2 g $Al(OH)_3$ (c)
	Sera von Kaninchen, vorbehandelt mit nativem Extrakt (a)				Sera von Kaninchen, vorbehandelt mit ads. Extrakt (c)				Serum von Kaninchen, vorbehandelt m. ads. Extr. (b)	
	391		398		399		400		407	
0,25	++++	++++	+++	+++	—	—	—	—	—	—
0,15	++++	++++	+++	++	—	—	—	—	—	—
0,05	++++	++++	++	—	—	—	—	—	—	—
0,03	++++	+++	+	—	—	—	—	—	—	—
0,01	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Stoffe antigener Natur enthalten, spricht der Umstand, daß die mit adsorbierten Extrakten vorbehandelten Kaninchen keine Antikörper gegenüber diesen Extrakten gebildet haben. Wie ist also die positive Reaktionsweise der Sera der mit nativen Extrakten vorbehandelten Kaninchen zu verstehen? Man wird wohl mit der Annahme nicht fehlgehen, daß es sich hierbei um den Ausdruck einer durch den Immunisierungsprozeß bedingten Serumlabilität handelt. Für eine solche Auffassung spricht auch die oben gezeigte Tatsache, daß die mit Adsorbentien vorbehandelten Extrakte in noch höherem Maße als die nativen fähig sind, eine derartige Labilitätsreaktion zu geben. Diese Serumlabilität dürfte, nach den bisherigen Versuchen zu beurteilen, nur dann auftreten, wenn nebenbei eine wirkliche Antikörperbildung stattfindet; denn dieses Phänomen wird vermißt bei den mit adsorbierten Extrakten ausgeführten Immunisierungsversuchen.

Um diese Frage weiter zu klären, wurde die von H. Sachs und F. Georgi (35) angegebene Methode der Säurefällung der labilsten Globuline angewandt. Dieses Verfahren gestattet die Ausschaltung der unspezifischen Reaktionsfähigkeit, während die spezifische, auf Antigen-Antikörperreaktion beruhende, erhalten bleibt. Naturgemäß ist ein derartiges Vorgehen nur dann beweiskräftig,

wenn die Reaktionsfähigkeit gegenüber nativen und adsorbierten Extrakten von vornherein rein quantitativ die gleiche war; denn anderenfalls müßte man den Einwand gelten lassen, daß die Vorbehandlung der Sera mit HCl die stärkere Reaktion zur Abschwächung, die schwächere zum Verschwinden gebracht hat, und man könnte dann nicht Rückschlüsse auf die Verschiedenartigkeit der beiden Reaktionsweisen ziehen.

In dieser Hinsicht einwandfreie Verhältnisse wurden beim Serum 391 angetroffen, da es mit nativen und mit adsorbierten Extrakten fast gleich starke Reaktionsfähigkeit aufwies.

Methodisch wurde nach Sachs und F. Georgi in folgender Weise vorgegangen: 0,4 ccm inaktives Serum wurde mit 3,3 ccm 1/250 Normalsalzsäure (in Aqua dest.) gemischt. Nach halbstündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde zentrifugiert und zum Abguß 0,3 ccm 10proz. NaCl-Lösung hinzugefügt. Das so vorbehandelte Serum wurde in absteigenden Mengen im Komplementbindungsversuch gegenüber den Extrakten a bis d geprüft. Parallel war das unvorbehandelte mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1/10 verdünnte Serum 391 eingeschaltet. Die Ergebnisse zeigt Tabelle V.

Tabelle V.

Hemmung der Hämolyse durch Ambozeptor und Komplement nach Vorbehandlung des letzteren mit Extrakten und Kaninchenimmunseris.

Serummengen in ccm	Rinderherzextrakt cholester. (d)	Nativer Kissextrakt (a)	Kissextrakt ads. mit 1 g $Al(OH)_3$ (b)	Kissextrakt ads. mit 2 g $Al(OH)_3$ (c)
	Serum von Kaninchen 391, immunisiert mit nativem Extrakt (a).			
	a) Ohne Salzsäurefällung.			
0,25	++++	++++	++++	++++
0,15	++++	++++	++++	++++
0,05	++++	++++	++++	++++
0,03	++	++++	++	+
0,01	—	—	+	—
	b) Nach Salzsäurefällung.			
0,25	++++	++++	—	—
0,15	+++	++++	—	—
0,05	—	—	—	—
0,03	—	—	—	—
0,01	—	—	—	—

Aus der Tabelle V ist ersichtlich, daß das mit HCl-Fällung vorbehandelte Serum, wenn auch abge-

schwächt, mit den nativen Extrakten (a und d) reagiert, hingegen mit den adsorbierten Extrakten (b und c) gar nicht. Dieses Resultat ist um so beweiskräftiger, als die Reaktionsfähigkeit des unvorbehandelten Serums gegenüber dem nativen Extrakt d und gegenüber dem adsorbierten Extrakt b fast gleich stark war. Man wird daher annahmen dürfen, daß die Reaktionsfähigkeit der Antisera gegenüber adsorbierten Extrakten auf eine gesteigerte Labilität der genannten Sera zurückzuführen ist. Diese Labilität gibt sich gegenüber adsorbierten Extrakten um so eher kund, als ja letztere, wie gezeigt werden konnte, sehr zu unspezifischen Reaktionsweisen neigen.

Es muß noch darauf hingewiesen werden, daß die in dieser Arbeit erhobenen Befunde in Bezug auf die Reaktionsfähigkeit der Antisera gegenüber adsorbierten Extrakten den Resultaten der Tierimmunisierungsversuche von Landsteiner, Levene und van der Scheer zum Teil scheinbar widersprechen. Der Unterschied besteht darin, daß nach den Untersuchungen der genannten Autoren die Sera der mit dem chemisch nicht reinen Lezithinpräparat immunisierten Kaninchen nur mit diesem, aber nicht mit dem gereinigten Lezithin reagieren. Bei den hier ausgeführten Versuchen dagegen reagieren die Sera der mit nativem Phosphatidpräparat vorbehandelten Kaninchen auch mit den adsorbierten Extrakten, die ja keine Antigenfunktion mehr besitzen. Dieses unterschiedliche Verhalten dürfte dadurch bedingt sein, daß die mit Adsorbentien vorbehandelten Phosphatidpräparate keineswegs als chemisch rein anzusehen sind, sondern noch immer Substanzen zum Teil unbekannter Zusammensetzung enthalten. Man muß auch an die Möglichkeit denken, daß bei den Versuchen von Landsteiner, Levene und van der Scheer die kolloidale Struktur der Extrakte, die ja für das Zustandekommen der unspezifischen Reaktionen von entscheidender Bedeutung ist, eine andere war als die der in diesen Versuchen verwandten Präparate.

Diskussion.

Die Identität der beim Kaninchen künstlich erzeugten Wassermannschen Reaktion mit der menschlichen syphilitischen Blutveränderung wurde sogar in der letzten Zeit trotz der weitgehenden Parallelitäten zwischen beiden Reaktionsweisen von manchen Seiten angezweifelt. Man nahm an, daß bei Kaninchen eine gewisse

Lipophilie besteht, als deren Ausdruck die auch beim gesunden Kaninchen schon sehr häufig spontan bestehende Wassermannsche Reaktion aufzufassen sei. Bei dem Vorgehen nach Sachs und seinen Mitarbeitern (Kombinationsimmunisierungsmethode) sollte die eventuell latente „Lipophile" manifest gemacht werden. Dieser Hypothese wurde u. a. die Tatsache zugrunde gelegt, daß die Erzeugung von Lipoidantikörpern bisher bei anderen Tierarten bzw. bis vor kurzem beim Menschen nicht gelang. Neuerdings konnten jedoch F. Georgi und Ö. Fischer (37) nachweisen, daß die Lipoidantikörperbildung auch beim Menschen auszulösen ist, wenn man bei Anwendung der Kombinationsmethode nicht Schweineserum + alkohollösliche Organbestandteile nimmt, sondern das Schweineserum durch abgetötete Spirochäten ersetzt. Es besteht also durchaus die Möglichkeit, daß außer Kaninchen auch noch anderen Tierarten die Fähigkeit zukommt, Lipoidantikörper zu bilden, falls man statt Schweineserum andere Eiweißsubstanzen bzw. Spirochäten als Schlepper verwenden würde. Die Fähigkeit der Kaninchen, auch bei Immunisierung mit Schweineserum + Lipoiden Lipoidantikörper zu bilden, dürfte auf die bekannte bessere Eignung dieser Tiere zur Antikörperbildung im allgemeinen beruhen [Sachs (23)].

Es wurden noch neuerdings Hypothesen erwogen, nach denen auch die syphilitische Blutveränderung nicht der Ausdruck einer echten Antikörperbildung, sondern eine Manifestation der „Lipophilie" sein sollte, die ja, wie erwähnt, mitunter schon physiologischerweise beim Kaninchen in Erscheinung treten soll. Beim Menschen könne diese „Lipophilie", so wurde behauptet, jedoch nur unter bestimmten pathologischen Bedingungen (speziell bei Syphilis), bei anderen Tierarten wiederum überhaupt nicht entstehen.

Nach den Versuchen von u. a. Ö. Fischer unterliegt es wohl kaum einem Zweifel, daß von einer besonderen Lipophilie des Serums bei der syphilitischen Erkrankung ebensowenig die Rede sein kann, als von einer rein kolloid-chemischen Natur der syphilitischen Blutveränderung. Konnte doch gezeigt werden, daß Extrakte nach Entfernung von gewissen Bestandteilen bei Erhaltung der ursprünglichen kolloidalen Beschaffenheit und des größten Teils des Lipoidgehaltes nicht mehr imstande sind, mit Syphilis-

seris zu reagieren. Die bekannten Lipoide spielen also keineswegs die Hauptrolle bei der Wassermannschen Reaktion, das eigentliche Reagens stellen offenbar gewisse noch unbekannte Substanzen, die unter den bestehenden Bedingungen alkohollöslich sind, dar.

In den vorliegenden Versuchen wurde nachgewiesen, daß nur native, zur Anstellung der Wassermannschen Reaktion beim Menschen geeignete, nicht aber mit Adsorbentien vorbehandelte Extrakte, die ja mit Syphilisseris nicht mehr reagieren, imstande sind, beim Kaninchen immunisatorisch eine Wassermannsche Reaktion zu erzeugen. Es kann daher nicht angenommen werden, daß etwa eine Vorbehandlung mit Schweineserum und Lipoiden im allgemeinen eine besondere „latente Lipophilie" unspezifisch zur Manifestation bringt. Offenbar ist die Auslösung der künstlichen Wassermannschen Reaktion beim Kaninchen ebenfalls an bestimmte, noch unbekannte Substanzen gebunden, die aller Wahrscheinlichkeit nach mit den die syphilitische Blutveränderung bedingenden Substanzen identisch sind.

Mit anderen Worten: Diese Substanzen allein und nicht die Lipoide im allgemeinen sind es, denen sowohl in vitro als auch in vivo die eigentliche Antigenfunktion zukommt, ein Umstand, der, wie erwähnt, wiederum für die Identität der beim Kaninchen erzeugten künstlichen und der durch Syphilis hervorgerufenen Wassermannschen Reaktion spricht.

Von diesen echten immunbiologischen Phänomenen ist die spontan auftretende nicht durch Syphilis und ähnliche Erkrankungen hervorgerufene Wassermannsche Reaktion beim Kaninchen scharf zu trennen. Sie ist auch nach den Untersuchungen von Sachs und F. Georgi durch die Labilität der Globuline bedingt, die zusammen mit Extrakten ebenfalls Komplement inaktivieren bzw. zu Flockungserscheinungen führen können. Die Uebereinstimmung dieser sichtbaren Manifestationen ist jedoch lediglich sekundärer Natur; die primäre diesen Erscheinungen zugrunde liegende Serumveränderung ist bei den beiden Reaktionsweisen eine durchaus andere.

Einen ähnlichen Entstehungsmechanismus wie die unspezifische Wassermannsche Reaktion beim Kaninchen dürften wohl die beim Menschen bei gewissen Erkrankungen (Zellzerfall,

Tumor, Tuberkulose, Fieber usw.) vorkommenden unspezifischen Reaktionsfähigkeiten mit Organextrakten besitzen. Ob die von Sachs geforderte theoretische Trennung der spezifischen und unspezifischen Reaktionsvorgänge durch Anwendung von mit Adsorbentien vorbehandelten Extrakten auch praktisch ausgeführt werden kann, müssen noch weitere entsprechende Versuche zeigen. Daß zum mindesten die unspezifische Wassermannsche Reaktion beim Kaninchen sich auch mit diesen mit Luesseris nicht mehr reagierenden Extrakten nachweisen läßt, konnte in den hier mitgeteilten Versuchen gezeigt werden.

Nach alldem erscheint es sehr wahrscheinlich, daß der Ausdruck „Lipophilie" auch bei diesen unspezifischen Reaktionen keine Berechtigung hat. Es liegt kein Anlaß vor anzunehmen, daß diese unspezifische Veränderung sich speziell in einer Reaktionsfähigkeit gegenüber Lipoiden manifestiert. Viel näher liegt der Gedanke, daß dieser Reaktionsmodus der Ausdruck einer gesteigerten Labilität der Globuline ist, die bei verschiedenen Erkrankungen des Menschen, und bei Kaninchen mitunter schon normalerweise vorkommt, und die sich im Prinzip gegenüber verschiedenen geeigneten labilen kolloidalen Systemen bzw. anderen geeigneten Kolloidfällungsmitteln gleichsam äußert, eine Auffassung, wie sie vornehmlich von Sachs vertreten worden ist [Sachs (38)].

Zusammenfassung.

1) Die cholesterinfreien Phosphatidpräparate nach Kiss sind imstande, gekoppelt an Schweineserum im Tierversuch Antisera zu erzeugen, die sowohl mit dem zur Immunisierung benutzten Präparat als auch mit cholesteriniertem Rinderherzextrakt in vitro reagieren; dagegen sind die mit Adsorbentien (Aluminiumhydroxyd) vorbehandelten, mit Syphilisseris nicht mehr reagierenden, Extrakte auch im Tierversuch zur Antikörpererzeugung nicht mehr fähig.

2) Die gleichen Verhältnisse wurden angetroffen bei den Flockungsreaktionen nach Sachs-Georgi, Kiss und Kahn.

3) Die Sera der mit nativen Extrakten, nicht aber die der mit adsorbierten Extrakten immunisierten Kaninchen zeigen im Gegensatz zu den menschlichen Syphilisseris eine Reaktionsfähigkeit auch

mit adsorbierten Extrakten. Diese letztere Tatsache wird auf eine durch die Immunisierungsprozesse bedingte Serumlabilität zurückgeführt. Diese Auffassung wird begründet:

a) mit der Fähigkeit der adsorbierten Extrakte, Serumlabilität in erhöhtem Maße anzuzeigen,

b) mit der fehlenden Fähigkeit dieser Extrakte, im Tierversuch irgendwelche Antikörper hervorzurufen,

c) mit der Aufhebung der Reaktionsfähigkeit des Kaninchenimmunserums nach Salzsäurefällung (Sachs und F. Georgi) gegenüber den adsorbierten, nicht aber gegenüber den nativen Extrakten.

Anmerkung: Auf die nach Abschluß dieser Arbeit erschienene wichtige Mitteilung von A. J. Weil und J. Berendes, „Adsorption und Elution des Antigens aus alkoholischen Organextrakten", Klin. Wochenschr., 1932, S. 70, konnte leider nicht mehr eingegangen werden.

Literaturverzeichnis.

1) Wassermann, A., Neisser, A., und Bruck, C., Deutsche med. Wochenschrift, 1906, No. 19.
2) Landsteiner, K., Müller, R., und Pötzl, D., Wiener klin. Wochenschr., 1907, No. 17 und 50.
3) Levaditi, C., und Yamanouchi, T., Compt. rend. Soc. Biol., T. 63, 1907, p. 740.
4) Porges, O., und Meier, G., Berlin. klin. Wochenschr., 1907, No. 15.
5) Weil und Braun, Wien. klin. Wochenschr., 1908, No. 5 und 17.
6) Sachs, H., Berl. klin. Wochenschr., 1911, No. 46.
7) — und Altmann, K., Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 14.
8) — und Rondoni, P., Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 1, S. 132.
9) Toyosumi, Zentralbl. f. Bakt., Bd. 51, 1904. — Nakano, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 76, 1913. — Breinl, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 29, S. 463. — Mundt, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 23, S. 463.
10) Landsteiner, K., und Simms, Journ. of exp. Med., Vol. 38, 1923, p. 127.
11) Sachs, H., Klopstock, A., und Weil, A. J., Dtsch. med. Wochenschr., Bd. 51, 1925, S. 589, 1017.
12) Doerr, R., und Hallauer, C., Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 45, 1925, S. 71.
13) Heinsheimer, S., Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 48, 1926, S. 438.
14) Brandt, R., Guth und Müller, R., Klin. Wochenschr., 1926, S. 655.
15) Heimann, F., und Steinfeld, J., Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 58, 1928, S. 181.
16) Georgi, F., und Fischer, Ö., Klin. Wochenschr., 1927, S. 948, 2031, 2278, 2328, 2423; 1931, S. 207.

17) Klopstock, A., Klin. Wochenschr., 1927, No. 5; Dtsch. med. Wochenschr., 1927, No. 30.
18) Kroó, H., und Schulze, Klin. Wochenschr., 1928, S. 2246; 1929, S. 783.
19) Sachs, H., Weichardts Erg., Bd. 9, 1928.
20) Freiwirth, E., Zeitschr., f. Immunitätsf., Bd. 46, 1925, S. 157.
21) Gaetani, G. F., Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 69, 1930, S. 277.
22) Sachs, H., und Bock, G., Arb. Inst. f. exp. Ther., Frankfurt, No. 21, 1928, S. 159.
23) — 12. Tagung des Dtsch. Vereins f. Mikrobiologie, Wien 1927.
24) Noguchi und Bronfenbrenner, Journ. exp. Med., Vol. 13, p. 1.
25) Bordet und Ruelens, Compt. rend. Soc. Biol., T. 82, p. 880.
26) Kiss, J., Technik und Theorie der Serumuntersuchung auf Syphilis. Jena, G. Fischer, 1930.
27) Scaltritti, A., Ann. Inst. Pasteur, T. 42, 1928, p. 1600, 1608.
28) Fischer, Ö., Klin. Wochenschr., 1931, S. 552.
29) — Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 71, 1931, S. 441 (I. Mitteilung).
30) Sachs, H., und Klopstock, A., Biochem. Zeitschr., Bd. 159, 1925, S. 491.
31) Landsteiner, Levene und van der Scheer, Journ. exp. Med., Vol. 46, 1927, p. 197.
32) Fischer, Ö., Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 72, 1931, S. 344 (II. Mitteilung).
33) Landtseiner, K., Biochem. Zeitschr., Bd. 119, 1921, S. 294.
34) Klopstock, A., und Selter, G. E., Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 55, 1928, S. 118, 450; Bd. 57, 1928, S. 174; Bd. 63, 1929, S. 463.
35) Sachs, H., und Georgi, F., Klin. Wochenschr., 1923, S. 880.
36) Heimann, F., und Weil, E., Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 68, 1930, S. 403.
37) Fischer, Ö., und Georgi, F., Klin. Wochenschr., 1930, S. 1817.
38) Sachs, Jahreskurse f. ärztliche Fortbildung, Oktober 1931.

Lebenslauf.

Am 31. Dezember 1906 wurde ich als Sohn des Gastwirtes Arthur Rónai in Pištany (Tschechoslovakei) geboren. In Mährisch-Ostrau besuchte ich die deutsche Volksschule und die deutsche Staatsrealschule. 1922 verzogen meine Eltern nach Breslau und 1923 wurde ich an der hiesigen Gerhart Hauptmann-Oberrealschule aufgenommen, an der ich Ostern 1927 die Reifeprüfung bestanden habe. Im Sommersemester 1927 begann ich an der hiesigen Universität mit dem Medizinstudium und bestand hier am 26. Juli 1929 die ärztliche Vorprüfung. Das Staatsexamen gedenke ich nach dem Sommersemester 1932 in Breslau abzulegen. Ich habe alle bisherigen Studiensemester in Breslau absolviert.